

Vanadate 의 혈소판 응집작용과 Vanadium Yeast 의 억제효과

박승희 · 오승민* · 박영현** · 정규혁*#

식품의약품안전청, *성균관대학교 약학대학, **순천향대학교 식품영양학과

(Received September 30, 2002; Revised November 6, 2002)

Vanadate-induced Platelet Aggregation and Inhibition Effect of Vanadium Yeast

Seung Hee Park, Seung Min Oh*, Young Hyun Park** and Kyu Hyuck Chung*#

Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704 Korea,

*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746 Korea,

**Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 336-745 Korea

Abstract — It has been well known that vanadium shows various physiological and pharmacological properties such as an insulin-mimetic effect. In view of the reported toxic effects there is the problems that the safety margin is narrow because of its strong toxicity. Vanadate was tested for its ability to cause blood aggregation. Although vanadate or H_2O_2 alone had little effect on platelet aggregation, treatment of vanadate and H_2O_2 together induced platelet aggregation indicated that it was occurred by pervanadate or hydroxyl radical produced from the reaction of vanadate and H_2O_2 . It was dependent on extracellular Ca^{2+} ion. Platelet aggregation caused by vanadate and H_2O_2 was inhibited by ascorbic acid, tocopherol, catalase, mannitol, and Tiron. In contrast to vanadate, vanadium yeast prepared by uptaking vanadate in yeast cells did not induce platelet aggregation in the presence of H_2O_2 .

Keywords □ Vanadate; vanadium yeast; platelet aggregation

1985년에 sodium orthovanadate가 항당뇨작용을 나타내는 것으로 보고된¹⁾ 이후 vanadium의 생리작용에 대하여 다양한 연구가 이루어져 왔다. Vanadium은 체내에 흡수된 후 주로 혈장으로 이동하며, 간장, 신장, 뼈 및 폐에 높게 분포하고 태반, 유즙 및 타액에도 존재한다. Blood-brain barrier를 포함한 세포막을 통과하며, 주로 신장을 통해 배설된다.²⁻⁵⁾ 체내에서는 +4가 및 +5가의 산화상태로 존재하며, 혈장 등의 체액에서 +5가인 vanadate (VO_4^-)로 분포되어 있으며, 음이온수송체계에 의해 세포로 들어가 glutathione에 의해 vanadyl로 환원되어 세포내에서는 +4가인 vanadyl (VO^{2+})로 존재한다.⁶⁾

Vanadate 자체는 용혈작용을 나타내지 않으나 NAD(P)H 첨가 시 용혈작용을 일으키며 vanadyl에 의한 용혈작용은 hydrogen peroxide, hydroxyl radical 및 HEPES radical이 관여하는 것으로 보고되었다.⁶⁾ Vanadium은 체내에서 vanadyl과 H_2O_2 의 반응

에 의해 생기는 hydroxyl radical에 의해 세포막의 과산화지질을 증가시키며,⁷⁾ 적혈구 세포막에서 과산화작용을 일으켜 용혈작용을 나타낸다.⁸⁾ 또한 vanadyl은 vitamin E 결핍 적혈구에서 용혈작용을 일으키며, 이러한 작용은 catalase 및 superoxide dismutase (SOD)와 같은 효소, deferoxamine 및 EDTA와 같은 chelator, ethanol 및 D-mannitol과 같은 hydroxyl radical scavenger에 의해 저해된다고 보고된 바 있다.⁴⁾

본 조사에서는 vanadate가 혈액응고 및 혈소판 세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 rat에 sodium orthovanadate를 투여한 후 혈액응고 시간에 미치는 영향을 관찰하였고 토끼 혈액에서 분리 세정한 혈소판 (washed platelets)에 미치는 영향을 투과도법을 이용한 혈소판 응집장치를 사용하여 조사하였다. 또한 vanadate의 혈소판 응집 작용기전을 확인하고 이 작용을 억제하는 물질을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 항산화제인 ascorbic acid 및 tocopherol, hydroxyl radical scavenger인 manitol, 새로운 킬레이트제인 Tiron이 vanadate와 H_2O_2 에 의해 유도되는 혈소판 응집작용에 미치는 영향을 관찰하였다. 아울러 vanadate의 독성영향인 혈소판 응집이 나타나지 않는 킬레이트 복합체로서

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031)290-7714 (팩스) 031)292-8800
(E-mail) khchung@skku.ac.kr

*Saccharomyces cerevisiae*와 배양하여 얻은 vanadium yeast의 가능성을 조사하기 위해 H_2O_2 존재하에서 vanadium yeast와 sodium orthovanadate의 혈소판 응집작용을 비교 관찰하였다.

실험방법

혈액응고 측정

6~7 주령의 건강상태가 양호한 Sprague Dawley (SD) 웅성 rat (170~200 g)는 제일상사에서 구입하여 $24 \pm 2^\circ C$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 1주일 이상의 순화를 거친 후 건강한 동물만 선별하여 실험에 사용하였다. 대조군 및 약물투여군 각각 10마리씩을 1군으로 하였으며 약물투여군은 24시간 절식시킨 후 sodium orthovanadate 10 mg/kg을 복강내 투여하였다. 투여후 3시간, 12시간, 24시간 및 72시간에 ether로 마취시켜 꼬리를 약 0.2 cm 잘라 $37^\circ C$ 의 주사용생리식염수에 넣고 혈액이 응고될 때까지 걸리는 시간을 측정하였다. 또 rat의 복부 정중선을 절개하여 복부대동맥으로부터 혈액 0.5 ml를 채취한 다음 $37^\circ C$ 수욕상에서 주사용생리식염수 50 μ l 및 3.4% $CaCl_2$ 50 μ l를 넣어 혈액이 응고될 때까지 걸리는 시간을 측정하였다.

혈소판 분리 및 응집능 측정

혈소판 현탁액의 조제는 토끼혈액을 citrate-dextrose용액 (혈액량의 1/6 : 65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, $250 \times g$ 로 10분간 원심분리한다. 상등액 (platelet rich plasma)을 분리한 후 침전물 (platelet rich pellet)을 Tyrode HEPES buffer pH 6.35 용액으로 2회 세척한 후, 마지막으로 Tyrode HEPES buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 세정 혈소판 (washed platelet)을 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경으로 계측하여, 혈소판 수가 $5 \times 10^8/m^3$ 가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Tyrode HEPES용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4.0 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.35% Albumin (BAS), 0.1% glucose이다.

혈소판 활성화 작용은 혈소판 형태 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 혈소판응집측정장치 (Whole-Blood Aggregometer)를 사용하였다. 혈소판 부유액 (Platelet rich plasma) 250 μ l를 취하여 $37^\circ C$ 로 1,200 rpm에서 교반하면서 3분이 경과한 후 sodium orthovanadate 또는 sodium metavanadate를 농도별로 넣고 다시 3분이 경과한 후에 H_2O_2 1 mM을 넣어 혈소판응집을 측정하였다. 최적응집농도를 찾아 $CaCl_2$ 를 농도별로 첨가하여 의존성을 측정하였다.

Vanadate로 유도한 혈소판응집에 대한 억제작용물질조사

Vanadate에 의해 유도되는 혈소판 응집작용에 대해 저해작용

이 있는 물질을 조사하기 위해 혈소판 부유액에 ascorbic acid, tocopherol, SOD, catalase, mannitol, Tiron을 농도별로 첨가한 후 sodium orthovanadate 100 μ M을 넣고 3분 후 H_2O_2 1 mM을 가하여 혈소판 응집을 측정하였다.^{9,10} 또한 yeast cell에서 배양하여 얻은 vanadate와 yeast와의 결합체 (vanadium yeast)의 작용을 조사하기 위해 혈소판 부유액에 vanadium yeast를 넣고 3분 후에 H_2O_2 1 mM을 가한 다음 혈소판 응집을 측정하였다.

Vanadium yeast 제조

Yeast cells인 *Saccharomyces cerevisiae* H 1022를 1% yeast extract, 2% peptone 및 2% glucose를 함유하는 YEPD 배지에 접종한 다음 $25^\circ C$ 에서 24시간 shaking incubator에서 배양하였다. 지수기까지 배양한 yeast cell을 원심분리하여 harvest한 다음 harvested cell을 빙냉증류수로 3회 세척하였다.

Cell을 harvest한 직후 2% harvested yeast와 150 mM phosphate buffer (pH 6.0), 및 250 mM glucose 혼합액에 5 mM sodium orthovanadate를 넣은 다음 $25^\circ C$ 에서 24시간 shaking incubator에서 배양하였다. 배양이 완료된 vanadium yeast 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하여 vanadium yeast cell을 harvest하였다. Yeast cell 세포막 표면에 부착된 vanadium을 제거하기 위하여 50 mM EDTA (pH 7.0)로 4회 세척하여 원심분리하고 잔류물을 $100^\circ C$ 에서 5시간 건조한 다음 vanadium yeast로 하였다.¹¹

통계학적검사

모든 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 대조군과 약물투여군과의 차이는 Student's t-test를 이용하여 유의성을 결정하였다.

실험결과 및 고찰

Vanadate의 혈액응고 및 혈소판 활성화작용

실험동물 rat의 복강내에 sodium orthovanadate 10 mg/kg을 투여한 후 혈액응고시간 변화를 측정한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 투여 12시간 이후부터 대조군에 비해 혈액응고시간이 현저히 짧아지는 것을 관찰할 수 있었다. 채혈한 혈액에 $CaCl_2$ 를 첨가한 다음 혈액응고시간 변화를 측정한 결과에서도, Fig. 2에서 보는 바와 같이 투여 24시간 이후부터 vanadate 투여군에서 대조군에 비해 혈액응고시간이 현저히 짧아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이로 미루어보아 vanadate가 혈액응고를 촉진시키는 작용이 있는 것으로 나타났다.

Vanadate의 혈액응고작용에 대하여 혈소판의 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 토끼 혈소판에 sodium orthovanadate 및 sodium metavanadate를 농도별 (0~100 μ M)로 넣고 3분 후 H_2O_2 1 mM을 첨가한 후 혈소판응집의 변화를 측정한 결과, Fig.

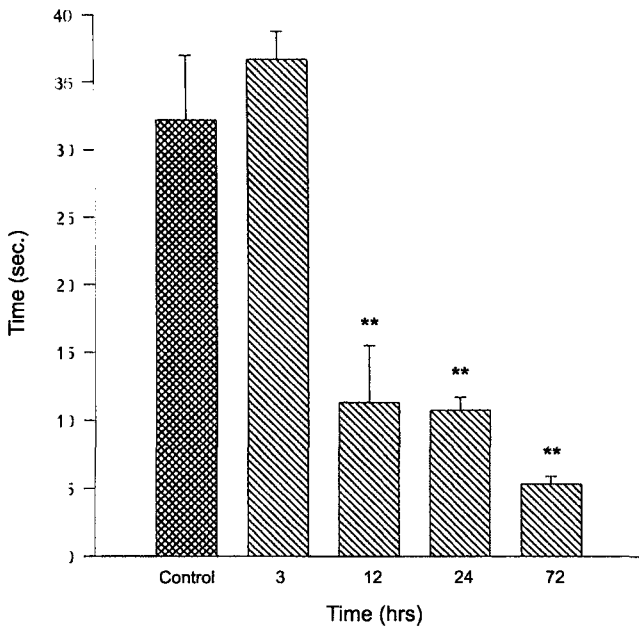


Fig. 1 - Effect of vanadium on blood clotting time by elapsed time in tails of S.D. rats treated intraperitoneally with vanadate (10 mg/kg) (**p<0.01).

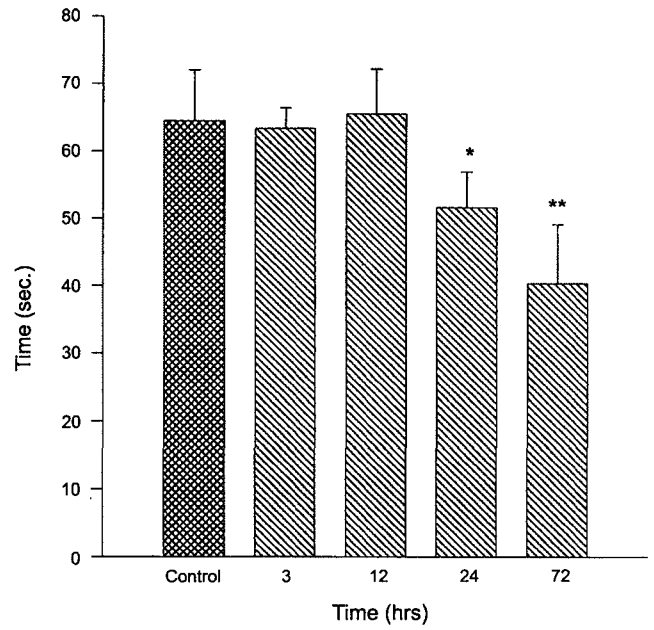


Fig. 2 - Effect of vanadium on blood clotting time by elapsed time in S.D. rats treated intraperitoneally with vanadate (10 mg/kg) (**p<0.01, *p<0.05).

3에서 보는 바와 같이 H₂O₂ 단독투여시에는 혈소판응집이 나타나지 않았으나 H₂O₂ 첨가시 sodium orthovanadate 및 sodium metavanadate의 농도 증가에 비례하여 혈소판 응집이 증가하는 경향을 나타내었다. 100 μM의 sodium orthovanadate 및 sodium metavanadate를 각각 투여한 3분 후 H₂O₂를 0~1 mM 농도로 농도별로 투여한 결과 sodium orthovanadate 및 sodium metavanadate를 단독으로 투여한 동안에는 혈소판 응집이 나타나지 않았으나 H₂O₂를 농도별로 투여한 이후에는 H₂O₂의 농도가 증가할수록 혈소판응집이 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 4).

이러한 작용은 orthovanadate가 metavanadate 보다 강하게 나타났다. 혈소판에는 protein tyrosine kinase (PTPase)가 고농도로 존재하며 vanadate와 H₂O₂와 반응하여 생성되는 pervanadate는 세포투과가 용이하고 PTPase 저해작용이 있어 protein tyrosine phosphorylation을 증가시킴으로서 혈소판 응집을 나타내는 것으로 보고되어 있다.⁹⁾

세포의 Ca²⁺ 농도에 따른 영향을 관찰하기 위해 토끼 혈소판에 100 M sodium orthovanadate 및 100 μM sodium metavanadate를 각각 넣고 3분 후 1 mM H₂O₂를 첨가한 다음 1 mM EGTA

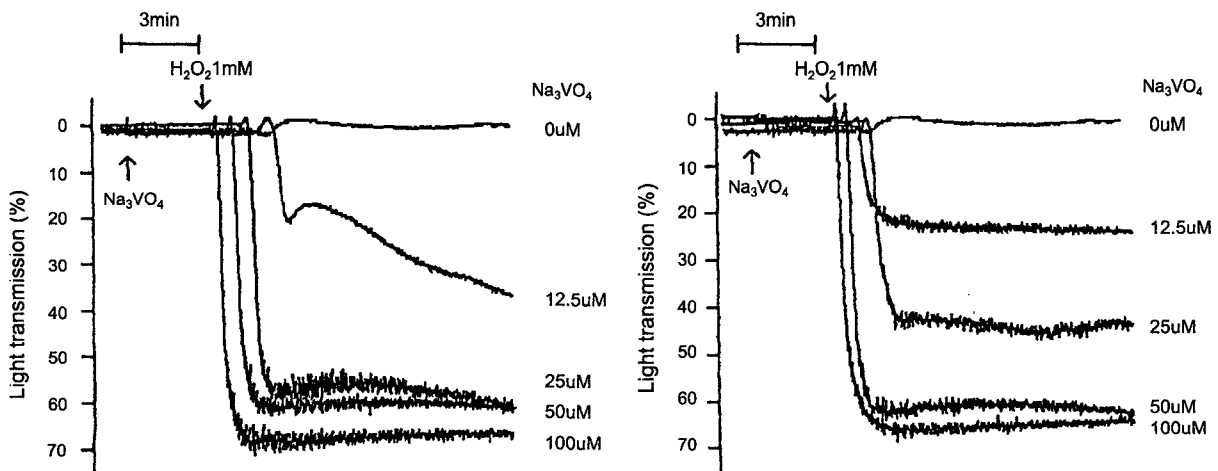


Fig. 3 - Dose dependent effect of vanadate on H₂O₂(1 mM)-induced platelet activation.

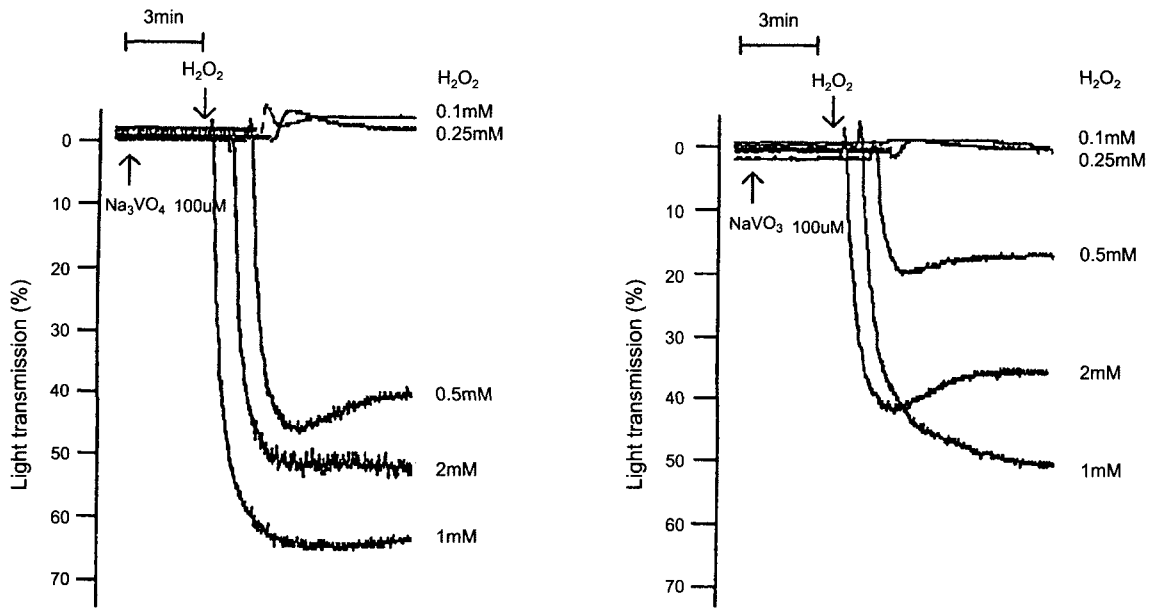


Fig. 4 – Dose dependent effect of H₂O₂ on vanadate(100 μM)-induced platelet activation.

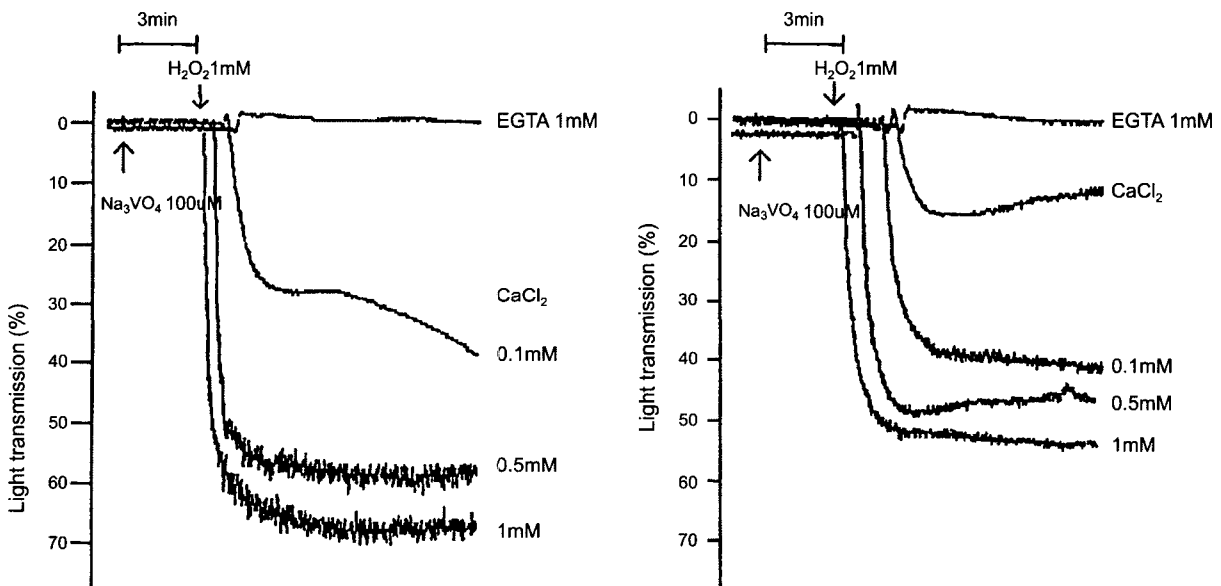


Fig. 5 – Effect of CaCl₂ on platelet activation induced by vanadate (100 μM) and H₂O₂ (1 mM) co-treatment.

(Ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid)를 첨가하고 CaCl₂를 농도별로 첨가한 후 혈소판응집의 변화를 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이, EGTA 첨가시 혈소판응집을 나타내지 않았으나 CaCl₂ 첨가시 CaCl₂의 농도가 증가할수록 혈소판응집이 증가하는 경향을 나타냈다. 따라서 Ca²⁺이 혈소판 활성화에 관여하는 것으로 사료된다.

Vanadate로 유도한 혈소판 응집작용에 대한 억제작용물질
Vanadate와 H₂O₂에 의해 유발되는 혈소판 응집에 대해 저해

작용을 가지는 물질을 조사하기 위해 항산화제, hydroxyl radical scavenger, chelator 등의 영향을 조사하였다. 토끼 혈소판에 조사대상 물질 각각을 농도별로 첨가한 후 100 μM sodium orthovanadate를 넣고 3분 후 1 mM H₂O₂를 첨가한 다음 혈소판응집의 변화를 측정하였다.

항산화제인 ascorbic acid 및 tocopherol을 조사한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 혈소판 활성화 작용을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 나타났다. 항산화효소인 SOD 및 catalase는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 SOD는 혈소판 활성화작용에 영향을 미치지

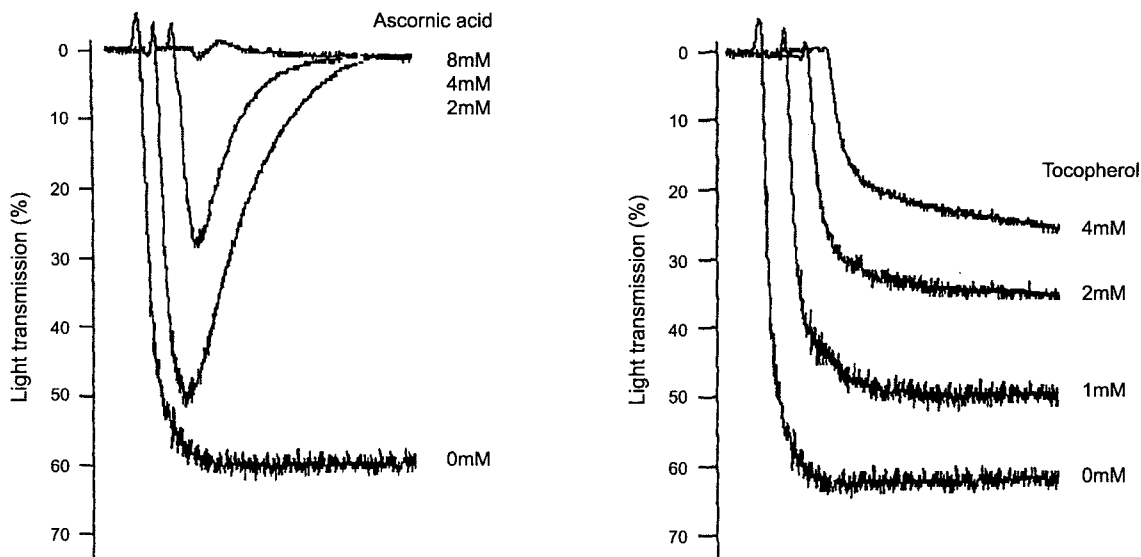


Fig. 3 - Effects of ascorbic acid and tocopherol on platelet activation induced by vanadate (100 μM) and H₂O₂ (1 mM) co-treatment.

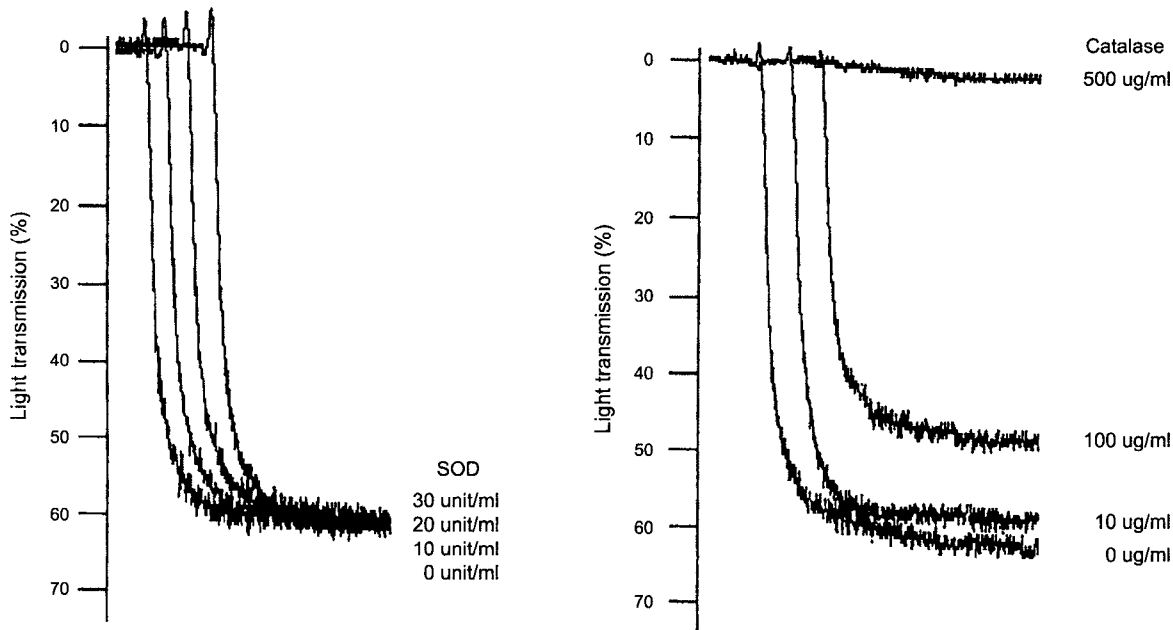


Fig. 7 - Effects of superoxide dismutase and catalase on platelet activation induced by vanadate (100 μM) and H₂O₂ (1 mM) co-treatment.

지 않았으나 catalase는 농도의존적으로 혈소판 활성화를 저해하는 것으로 나타났다. Hydroxyl radical scavenger인 mannitol을 농도별로 첨가한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 투여 농도에 비례하여 혈소판 응집이 현저히 감소하는 것으로 보아 vanadate와 H₂O₂에 의한 hydroxyl radical의 생성을 mannitol이 저해하여 이러한 작용이 나타남을 알 수 있었다. 따라서 vanadate의 혈소판 응집작용은 H₂O₂와의 반응에 의해 생성되는 과산화물에 의해 일어나는 것을 확인할 수 있었으며 H₂O₂를 감소시키는 항산화제 또는 과산화 반응물의 생성을 억제하는 물질에 의해 혈소

판 응집작용이 억제됨을 알 수 있었다.

또한 Chelator인 Tiron을 첨가하였을 때에는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 혈소판응집이 강하게 나타나 vanadate와 킬레이트를 형성하여 H₂O₂와 반응할 수 없는 상태가 된 경우에도 혈소판 응집작용이 억제되는 것을 알 수 있었다. 따라서 *Saccharomyces cerevisiae*와 배양하여 생성된 vanadium yeast의 복합체가 세포내 성분과 킬레이트를 형성함에 따라 혈소판 응집작용이 억제되는 지를 관찰하였다. Sodium orthovanadate 대신에 vanadium yeast를 넣고 3분 후에 H₂O₂를 첨가한 결과 Fig. 10에서 보는 바

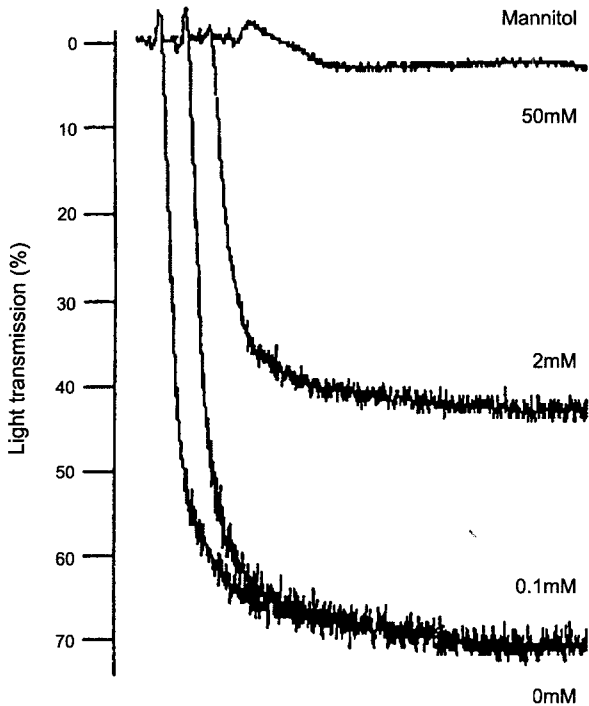


Fig. 8 – Effect of mannitol on platelet activation induced by vanadate (100 μM) and H₂O₂ (1 mM) co-treatment.

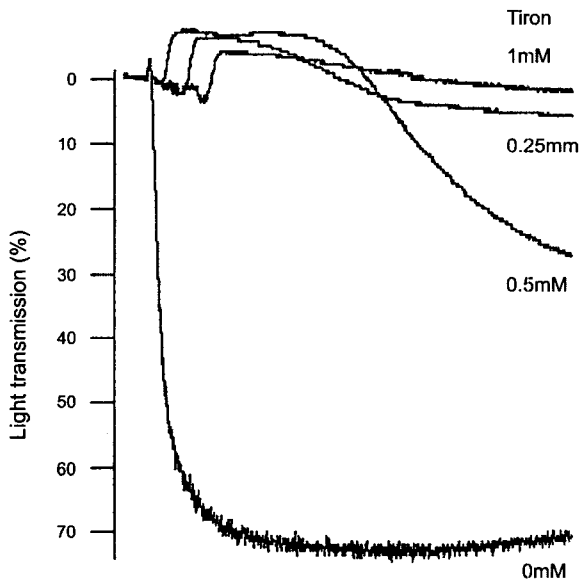


Fig. 9 – Effect of Tiron on platelet activation induced by vanadate (100 μM) and H₂O₂ (1 mM) co-treatment.

와 같이 sodium orthovanadate 투여군에서 관찰되었던 혈소판 응집이 나타나지 않았다. 따라서 yeast와의 결합체 형성에 의해 vanadate와 H₂O₂와의 반응성이 저해되어 pervanadate의 생성이 억제되며 이로 인하여 vanadate와 H₂O₂와의 작용에 의해 나타나는 protein tyrosine phosphorylation의 증가가 일어나지 않아

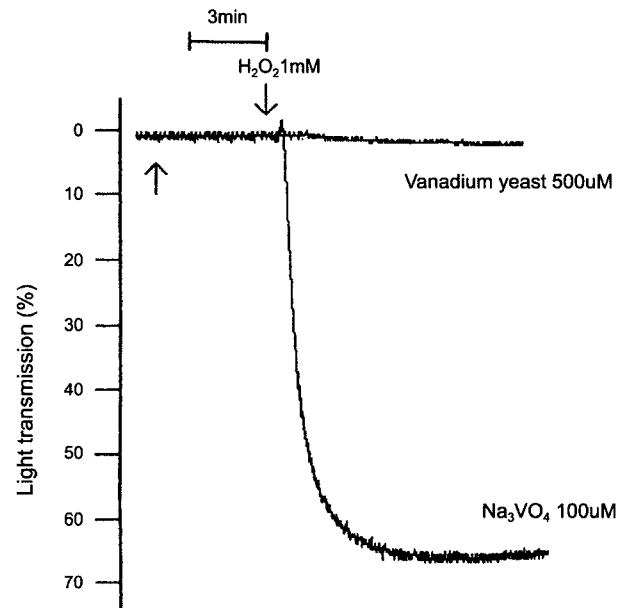


Fig. 10 – Effect of vanadium yeast and H₂O₂ (1 mM) co-treatment on platelet activation.

혈소판 응집작용이 억제되는 것으로 추정되었다. 따라서 vanadium yeast가 혈소판에 대한 활성화 작용이 없는 vanadate화합물로서 사용할 수 있을 것으로 기대되었다.

결론

실험동물 rat에 sodium orthovanadate를 투여한 결과 혈액응고시간이 감소되어 vanadate가 혈액응고를 촉진시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 토끼 혈소판에 sodium orthovanadate 및 sodium metavanadate 또는 H₂O₂를 단독으로 첨가하였을 때는 혈소판 응집이 나타나지 않았으나 함께 투여하였을 때는 혈소판 응집이 농도의존적으로 증가하여 vanadate와 H₂O₂와의 반응에 의해 생성되는 pervanadate 등 과산화 생성물에 의해 혈소판이 활성화되는 것으로 추정되었다. CaCl₂를 첨가한 결과 농도의존적으로 혈소판 응집이 촉진되어 세포의 Ca²⁺이 혈소판 활성화에 관여하는 주요 인자임을 알 수 있었다. Vanadate에 의한 혈소판 활성화작용을 억제하는 물질을 조사한 결과 항산화작용이 있는 ascorbic acid, tocopherol, catalase 및 hydroxyl radical scavenger 인 mannitol이 억제작용을 나타내었으며, chelator인 Tiron에 의해서는 매우 강한 억제작용이 있었다. 한편 *Saccharomyces cerevisiae*와 배양하여 생성된 vanadium yeast의 복합체가 세포 내 성분과 킬레이트를 형성함에 따라 혈소판 응집작용이 억제되는 지를 관찰한 결과 sodium orthovanadate와 달리 H₂O₂를 첨가하여도 혈소판 응집작용을 나타내지 않았다. 따라서 혈소판에 대한 활성화 작용이 없는 vanadate화합물로서 사용할 수 있을 것으로 기대되었다.

문헌

- 1) Heyliger, E. C., Tahiliani, G. A. and McNeill, J. H. : Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*. **227**, 1474 (1985).
- 2) Roshchin, A. V., Ordzhonikidze, E. K. and Shalganova, I. V. : Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **24**(4), 377 (1980).
- 3) Hopkins, L. L. and Tilton, B. E. : Vanadium as an essential nutrient. *Fed. Proc.* **33**(6), 1173 (1966).
- 4) Toney, J. H., Murthy, M. S. and Marks, T. J. : Biodistribution and pharmacokinetics of vanadium following intraperitoneal administration of vanadocene dichloride to mice. *Chem. Biol. Interact.* **66**(1), 45 (1985).
- 5) Canalis, E. : Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat calvariae. *Endocrinology*. **116**(3), 855 (1985).
- 6) Hamada, J. : Vanadium induced hemolysis of vitamin E deficient erythrocytes in Hepes buffer. *Experientia*. **50**(1), 49 (1994).
- 7) Adler, A. J., Caruso, C. and Berlyne, G. M. : The effect of aluminum on the vanadium-mediated oxidation of NADH. *Nephron*. **69**(1), 34 (1995).
- 8) Zaporowska, H. and Wasilewski, W. : Haematological effects of vanadium on living organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C*. **102**(2), 223 (1992).
- 9) Inazu, T., Taniguchi, T., Yanagi, S. and Yamamura, H. : Proteintyrosine phosphorylation of intact human platelets by vanadate with H₂O₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 259 (1990).
- 10) Young-Hyun Park : Effect of marine toxins on the rabbit platelets. *J. Fd. Hyg. Safety*. **10**(2), 73 (1995).
- 11) Bode, H. P., Friebel, C. and Fuhrmann, G. F. : Vanadium uptake by yeast cells. *Biochimical et Biophysica Acta*. **1022**, 163 (1990).